

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 黒田 晋之介

横浜市立大学大学院医学研究科 泌尿器科学

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 組織学 教授 大 保 和 之

副査 横浜市立大学附属市民総合医療センター 病院長 榑 原 秀 也

副査 横浜市立大学附属病院 臨床検査部 准教授 山 崎 悦 子

Early and late paternal effects of reactive oxygen species in semen on embryo development after intracytoplasmic sperm injection

(顕微授精後の胚発育における精液中活性酸素の早期および後期父性効果)

1. 序論

平成 27 年度の厚生労働省調査研究（湯村, 2016）によれば, 現在我が国の生殖可能年齢カップルの 6 組に 1 組が不妊症であり, そのカップルの約半数に男性不妊症が認められる. その最多の原因が造精機能障害(82.4%)であるが, その約 50%が特発性つまり原因不明である. そのような中で, 酸化ストレスと男性不妊症の関連が近年注目されており, 病態としてのエビデンスが蓄積されつつある. 活性酸素(Reactive oxygen species: ROS)は H_2O_2 やフリーラジカルなどの総称であるが, 精液中 ROS は 1987 年 Aitken らによって化学発光量測定法を用いて同定された (Aitken et al., 1987). 低濃度の ROS は精子のアクロソーム反応, 超活性化, capacitation, 卵との融合といった受精過程に必須であることが知られているが, 高濃度の ROS は酸化ストレスを生じさせ, 精子細胞膜の脂質過酸化などを引き起こし精子の運動率や受精率を低下させると考えられている (Agarwal et al., 2003). 竹島らは精液中のパラメータと精液中 ROS の間に有意な負の相関を認めたことを報告している (Takeshima et al., 2017). また湯村らの報告では (Yumura et al., 2009), 不妊症カップルにおいて自然妊娠群と非妊娠群で精液中 ROS を比較すると非妊娠群の男性で有意に精液中 ROS が高いということが示された. 一方で高濃度の精液中 ROS は精子 DNA 断片化にも関与し, 生殖補助医療技術(Assisted reproductive technology: ART)においても受精率や妊娠率に悪影響を与えることが報告されている (Sukcharoen et al., 1996; Zorn et al., 2003). しかし胚発育に関連したデータは乏しく, とくに詳細な胚発育ステージにおける精液中 ROS の影響は報告されていない. そこで今回我々は顕微授精(Intracytoplasmic injection: ICSI)における受精および胚発育と, 精液中 ROS との関係性を実証すべく検討を行った.

2. 対象と方法

2013 年 3 月~2016 年 12 月に横浜市大附属市民総合医療センター生殖医療センターにて ICSI を行い同意が得られたカップルのうち, 女性が 43 歳未満, MII 卵が 1 個以上獲得できた 77 組, 161 サイクルより採取された卵 887 個を対象とした. ROS 値測定には採卵以前に採取された精液の中で直近のものをを用いた. 測定器は monolight 3010™を使用し, 0.5 μ L の原精液に 100mM ルミノール 40 μ L を添加して 200 秒間化学発光を測定し積分したものを ROS 総量とした. 対象の卵において, 1)受精群と非受精群での ROS 値の比較, 2)受精した胚のうち, Day3 における良好胚到達群と非到達群での ROS 値の比較, 3)受精した胚のうち初期胚移植を行った ICSI サイクル由来の胚を除き, Day5 における良好胚盤胞到達群と非到達群での ROS 値の比較を行った. また Receiver operating characteristic 曲線より Day3 の良

好胚到達, Day5 の良好胚盤胞到達を予測する ROS 値を検討した.

3. 結果

受精率は 65.4%であり, 受精群と非受精群で ROS 値に有意な差は認められなかった(54204 ± 7454 Relative Light Units: RLU vs 52018 ± 9052 RLU, $P=0.858$). Day3 における非良好胚到達群において ROS 値は有意に良好胚到達群よりも高く (35645 ± 6934 RLU vs 81451 ± 45234 RLU, $P=0.0026$), Day5 における非良好胚盤胞到達群において有意に良好胚盤胞到達群よりも高かった (27916 ± 16336 RLU vs 81780 ± 14498 RLU, $P=0.015$). 良好胚到達, 良好胚盤胞到達予測の ROS カットオフ値はそれぞれ 6601 RLU, 4926 RLU であった. カットオフ値を用いた高 ROS 群と低 ROS 群と比較すると, 有意に良好胚到達率, 良好胚盤胞到達率は低 ROS 群で高かった (51.5% vs 63.8% , $P=0.004$; 11.2% vs 24.8% , $P=0.001$).

4. 考察

結果より, 受精・非受精群間には精液ROS値に有意な差はなく, Day3初期胚およびDay5胚盤胞においてはそれぞれ良好到達群よりも非到達群で有意に精液中のROS値が高かった. このことから胚発育の初期および後期において精液ROSは悪影響を与えていると考えられた. 胚発育において, 精子DNAの損傷のような精子由来, すなわち父性効果の影響は初期胚から胚盤胞形成といった後期過程に影響を及ぼすと考えられていた(Tesarik et al., 2004). しかし近年ではDNA 損傷は胚発育前期にも同様に影響する可能性が報告されている(Simon et al., 2014). 精液中ROSの胚発育における詳細なステージへの影響についての既存の報告は我々が調べたかぎりみられないが, 高濃度ROSは精子DNAの損傷を誘導することから, 結果的に早期および後期の胚発育に悪影響を与えていると考えられた. また良好初期胚到達と胚盤胞到達では予測ROS値が異なり, カットオフ値は良好初期胚到達の方が高かった. このことから初期胚から良好胚盤胞まで到達するためには, より精液ROSが低い条件であることが必要と考えられた.

本研究結果から高い精液中 ROS は ICSI における胚発育の初期および後期において悪影響を与えていると考えられた. また得られた所見から ICSI の胚発育予測因子として ROS 値が有用である可能性が示唆された.

論文審査結果の要旨

審査にあたり上記論文要旨の説明が行われた後, 以下の質疑応答が行われた.

山崎副査より 1)なぜ ICSI の胚発育への ROS 影響を評価しようという発想に至ったのか. 着床率, 妊娠率は検討していないか. 2)採卵時の精液ではなく直近の精液中 ROS を測定し

ているが、再現性は高いのか。3)男性の年齢や基礎疾患などによる影響はないのか。4)不妊男性の中でも精液 ROS が低い群は正常男性群と比較して値は低いのか高いのか、との質問がなされた。これらに対し、1)精液中 ROS とパラメータの相関のみでは不妊治療のアウトカムを改善したことの証明にはならず、実際の不妊治療成績と相関を示す必要があるが、自然妊娠などは女性因子など因子が多すぎるため困難である。一方で顕微授精の胚発育においては女性因子が極力省かれており、少ない因子の中で精液中 ROS の影響を検討することができたためである。着床・妊娠率については検討しておらずリミテーションとなるが、今回は女性因子をなるべく排除し胚発育にフォーカスを絞って検討した。2)直近の精液を用いていることは本検討の大きなリミテーションであるが、精液中 ROS は一般精液検査よりも再現性は高いと考えられており、採卵時の精液中 ROS をある程度反映していると考えられる。3)基礎疾患について今回検討は行っていないが、男性の年齢は単変量解析で有意差は認めなかった。4)本検討で妊娠性が正常コントロール群との比較はしていないが、精液所見が正常なのに妊娠性が低い群では精液中 ROS が高いという報告はある。ただし精液中 ROS が高いことが全ての男性不妊の原因ではなく、精液中 ROS が低くても妊娠性が低下している症例は存在する、とそれぞれ回答した。

続いて榊原副査より 1) DNA の断片化について精液中 ROS の影響ということだが、ICSI において精子が ROS にさらされている時間はどれくらいなのか。2)体質的に酸化ストレスの高い患者もいると推測されるが、血中の ROS 濃度と精液中 ROS の相関を示唆するデータはあるか。3)精巣内精子採取術などで精巣組織を採取した際に組織中の ROS を測定することは可能か。4)来年度から留学すると聞いているが、今回の研究を発展させるような検討が継続できるのか、との質問がなされた。これらに対し、1) ROS 産生過剰の原因は内因性と外因性があり、それぞれ影響する時間が異なる。例えば未熟精子から ROS が過剰産生されるが、これは精細管内で産生されており、精子は射出前からこのような過剰な ROS に精細管内で暴露されていると考えられる。2) 今回は検討していないが、既存の報告では生活習慣病などがある集団で精液中酸化ストレスが高いという報告があり、全身状態と精液中 ROS の相関は示唆されている。しかし自施設で行った血液中酸化ストレスマーカーと精液中 ROS の比較では明らかな相関は認めなかった。全身と関連しているのはおそらく間違いないが、血中の値に反映されていない可能性がある。3)可能であるが、精巣内精子採取術を行う患者群は無精子症の患者であり、ポピュレーションが限定的になってしまう。男性不妊症患者全体に対して行うのは侵襲が高いと考えられる。4)来年度より Ashok Agarwal 教授らの研究グループのもと、research fellow として研究に従事する予定である。Agarwal らのグループは精液中酸化ストレスについて世界でも有数の検討・論文報告を行ってきたグループであり、精液中酸化還元電位についても近年有用性を積極的に検討・報告している。自施設での経験を活かせる環境であり、引き続き精液中酸化ストレス研究に従事したい、とそれぞれ回答した。3)については今後の展開について組織中や全身の ROS との相関を検討する

と良いのではないかと、4)について今後酸化ストレスがビタミンなどの抗酸化療法により改善され精液の質が改善するということが示されれば不妊症の臨床に有用であり、今後の成果を期待したい、とアドバイスがあった。

続いて大保主査より、1)今回の結果は自分で解析などを担当したのか。2) ICSI に用いる精子の頭部形態異常やミトコンドリアの異常は評価しているのか。また文献的な報告はあるのか。3)男性不妊症である場合に、最終産物である精子だけでなく、途中の Spermatogenesis においても異常があるケースも当然考えられるが、臨床では組織を生検するようなことは通常行わないのか。4) (コメントとして)ART 技術の歴史はまだ長くないが、ART によって次世代へ異常が伝わり蓄積していったのか。そういうデータや検討も必要ではないか。という質問があった。これらに対し、1)データの収集・解析は自分で行った。2) 文献的にはミトコンドリア機能やクロマチン凝集の精子機能への影響は報告されており、Reviewer からの指摘もあった。ROS の影響メカニズムをさらに検証するには有用と思われるが、今回は検討しておらず、今後の検討課題としたい(また回答し損じたが、精子頭部の脱収縮や染色体早期凝集も ICSI の受精障害に関わることが報告されている)。3)通常診療では侵襲が高く行われにくい、無精子症の精索静脈瘤などで精索静脈瘤手術を先行する場合、今後の治療効果予測をする目的で精巣生検を合わせて行う場合はある。4)ART 出生児に染色体疾患や先天奇形が多いという報告も散見されるが、治療を受けている患者群が高齢であることや対照群の設定が難しいことから単純な比較はできず、現在のところ ART による明らかな先天性疾患増加はないというのが不妊診療全体のコンセンサスである、とそれぞれ回答した。3)について、未分化な段階での異常が精子の形態異常へつながることが報告されており、将来的には組織全体像を評価していく必要があるのではないかと、アドバイスがあった。

審査結果

申請者が行った研究は、顕微授精後の早期および後期胚発育に対して精液中活性酸素が与える影響について示した初の研究報告であり、横浜市立大学医学博士号(乙号)の学位を授与するに値する業績であると、審査委員全員一致にて判断された。

令和3年1月8日